

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 25 APR 2003

WIPO PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 10 592.8

**Anmeldetag:** 11. März 2002

**Anmelder/Inhaber:** Curacyte AG, München/DE

**Bezeichnung:** Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und  
Verwendung

**IPC:** C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wehner

11. März 2002

Curacyte AG

C37296 BÖ/ATe

### **Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung**

Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose eines Tumors.

5

Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe wird durch ihr Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu durchdringen, ermöglicht. In diesem Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen vor allem dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) eine zentrale Bedeutung zu (P. Mignatti und D.B. Rifkin, *Physiol. Rev.* 73, 161-195, 1993). So bewirkt uPA die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u.a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA aktivieren (U. Reuning et al., *Int. J. Oncol.* 13, 893-906, 1998).

15

Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor. Dadurch wird eine Verstärkung und Fokussierung der Aktivität von uPA und damit der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht. Sowohl in zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die Bedeutung dieses zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumorwachstum und -ausbreitung gezeigt werden. So wird das invasive Potential von Tumorzellen bei Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,

20

25

6939-6943, 1990; M. Baker et al., Cancer Res. 50, 4876-4684, 1990). In Hühnerembryos konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., Cell 35, 611-619, 1983).

5

Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor (M. Schmitt et al., Thromb. Haemost. 78, 285-296, 1997; R.W. Stephens et al., Breast Cancer Res. Treat. 52, 99-111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentrationen an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al., Cancer Res. 54, 4671-4675, 1994; C. Duggan et al., Int. J. Cancer 61, 597-600, 1995).

Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und F. Markwardt, Pharmazie 33, 599-602, 1978). Das von Vassalli und Belin (FEBS Letters 214, 187-191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ( $K_i = 7 \mu M$ ).

Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen ( $K_i = 0,16 \mu M$  für Verbindung 623) gefunden. Hemmstoffe dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M.J. Towle et al.,

Cancer Res. 53, 2553-2559, 1993). Die Benzothiophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwändig.

5

Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ( $K_i = 2,4 \mu\text{M}$  für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5113-5118, 2000).

10

Im Gegensatz dazu erreichen  $N\alpha$ -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare  $K_i$ -Werte ( $0,41 \mu\text{M}$  für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., Bioorg. Med. Letters 9, 3147-3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 mit weiterentwickelten  $\beta$ -Naphthamidinen offenbart. Es werden  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.

15

20

Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (Methods in Enzymology, 80, 826-842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.

25

In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren beschriebene

nen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt. In jüngster Zeit wurden in WO 00/05 2 45 Peptidylaldehyde mitgeteilt, die C-terminal ein Argin und in P3  
5 ein D-Serin enthielten und uPA sehr wirksam hemmten. Nach Acylierung des Ser-Hydroxyl konnte für die Leitverbindung iBuOCO-D-Ser-Ala-Arg-H nach s.c.-Gabe eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % beobachtet werden (S. Y. Tamura et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 983-987, 2000). In PCT/EP WO 01/06789 werden Hemmstoffe offenbart, die sich von acyliertem Amidino-benzylamin ab-  
10 leiten und neben einer natürlichen Aminosäure in P2 einen D-Serin oder eine vergleichbare unnatürlichen Aminosäure enthalten. Verbindungen diese Typs hemmen Urokinase ( $K_i = 36$  nM für die wirksamste Verbindung) sehr wirksam. Allerdings haben Verbindungen diese Typs nur unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften für eine Anwendung in vivo; sie werden nach oraler Gabe kaumre-  
15 sorbiert und im Versuchstier nach i.v.-Gabe sehr schnell aus der Zirkulation eliminiert

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher Aktivität hemmt und der nach i.v.- oder s.c.-Gabe möglichst lange im Körper zirkuliert.  
20

Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen  $R_1$ , Y, X,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  natürliche  
25 und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, dann sowohl Urokinase sehr wirksam inaktivieren als auch insbesondere nach i.v.- oder s.c.-Gabe langsam aus der Zirkulation eliminiert werden, wenn neben der Amidinofunktion weitere geladene Gruppen vorzugsweise Carboxyl, Amino, Amidino, Hydroxyamidino, Amidrazono oder Guanidino eingeführt werden. Die Carboxylgruppen können auch ge-

schützt in Form ihrer Ester vorliegen, wobei bevorzugt Ethylester Verwendung finden. Diese Ester werden in vivo teilweise in die freien Säuren umgewandelt

Besonders geeignete Verbindungen sind in den Unteransprüchen aufgeführt.

5

Einen besonders bevorzugten Hemmstoff von Urokinase, der besonders langsam eliminiert wird bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Glutaminsäure und D-Serin gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe  $R_5$  aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sufonyl-Rest aufweist.

10

Bei einer starken Inaktivierung von Urokinase werden die zusätzlich geladenen 4-Amidino-benzylamin-Derivate auf vorteilhafte und überraschende Weise sehr langsam eliminiert, so dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine neue Gruppe von hochaktiven Urokinase-Hemmstoffen darstellen.

15

Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze, vorzugsweise mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder vorzugsweise als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

20

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie nachfolgend beschrieben, beispielsweise wie folgt hergestellt werden:

Aus dem kommerziell erhältlichen 4-Cyanobenzylamin (Showa Denko, Japan) wird das Boc-geschützte 4-Acetyloxamidinobenzylamin nach dem Fachmann bekannten Verfahren gewonnen. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe  $R_5$  mittels

25

Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminaler Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Die meisten Zwischenprodukte kristallisieren gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Endreinigung der Hemmstoffe erfolgt auf der letzten Stufe vorzugsweise über präparative, reversed-phase HPLC.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend einen erfindungsgemäßen Hemmstoff sowie weitere pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die z.B. der Stabilisierung und/oder Konservierung des Arzneimittels dienen, sind dem Fachmann allgemein geläufig (z.B. Sucker H. et al., (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Hierzu zählen beispielsweise physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Das Arzneimittel könnte beispielsweise in parenteraler Anwendungsform, insbesondere in intraartikler, intravenöser, intramuskulärer oder subcutaner Form, in enteraler Anwendungsform, insbesondere zur oralen oder rektalen Anwendung, oder in topischer Anwendungsform, insbesondere als Dermatikum, angewendet werden. Bevorzugt sind intravenöse oder subkutane Anwendungen.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Arzneimittel beispielsweise in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-, Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspen-

sion, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt.

- 5 Die Erfindung soll nachstehend anhand von drei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie zu beschränken:

Ausführungsbeispiel 1:

10 Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser-Glu-4-Amidino-benzylamid x TFA

1.1 Boc-4-Cyano-benzylamid

20 g (0,151 mol) 4-Cyano-benzylamin wurden in 300 ml H<sub>2</sub>O, 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml Di-tert.-butyl-  
15 dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei 0 °C sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i.V. entfernt und das Produkt wurde in Essigester und 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung aufgenommen. Die Essigesterphase wurde  
3Mal mit 5 %-iger KHSO<sub>4</sub>- und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen,  
über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i.V. eingengt (weiße Kristalle). HPLC: Acetonitril/H<sub>2</sub>O, Elution bei 44,1 % Acetonitril; Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87 %.  
20

1.2 Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid

Nach Judkins et al. (Synthetic Comm. 26, 4351-4367, 1996) wurden 30,48 g (0,131 mol) Boc-4-Cyano-benzylamid mit 13,65 g (0,197 mol) Hydroxylamin x  
25 HCl und 34 ml (0,197 mol) DIEA in 300 ml abs. Ethanol gelöst. Es wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz i.V. eingengt, der Rückstand in ca. 200 ml Essigsäure gelöst



und mit 18,67 ml (0,197 mol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 1 Std. wurde erneut eingeengt, in Essigester gelöst und bei 0 °C je 3-mal mit 5 %iger KHSO<sub>4</sub>- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Einengen i.V. fiel ein weißes Pulver an. HPLC: Acetonitril/H<sub>2</sub>O, Elution bei  
5 32,0 % Acetonitril; Ausbeute: 31,3 g (0,102 mol) 78 %.

### 1.3 4-Acetyloxamidino-benzylamin x HCl

5 mmol Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid werden in 20 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird i.V. weitgehend eingeengt, das Produkt mit trockenem Diethylether gefällt, abgefrittet,  
10 nochmals mit frischem Ether gewaschen und i.V. getrocknet. Auf Grund der quantitativen Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

### 1.4 Boc-Glu(OBz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid

Die Kopplung von Boc-Glu(OBz)-OH (Orpegen, Heidelberg) an 4-Acetyloxamidino-benzylamin x HCl erfolgte nach Frérot et al. (Tetrahedron 47, 259 ff., 1991). Dazu wurden 2,27 g (9,3 mmol) 4-Acetyloxamidino-benzylamin x HCl und 3,138 g (9,3 mmol) Boc-Glu(OBz)-OH in ca. 25 ml DMF gelöst. Bei  
20 0 °C wurden 4,84 g (9,3 mmol) PyBOP und 3,878 ml (27,9 mmol) TEA zugegeben und der pH-Wert mit TEA auf 9 eingestellt. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i.V. eingeengt, in Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i.V. eingeengt. Ausbeute: 4,1 g (7,8 mmol) 84 %.

25

### 1.5 H-Glu(OBz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid x HCl

4,1 g (7,8?? mmol) Boc-Glu(Bz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 100 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Dann wurde i.V. weitgehend eingengt und mit trockenem Diethylether gefällt, danach abgefrittet und das Produkt nochmals mit frischem Ether gewaschen. Nach Trocknen des Produkts i.V. wurde es ohne weitere Aufreinigung für die Synthese nach Punkt 1.7 eingesetzt.

5

#### 1.6 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH

229 mg (1,173 mmol) H-D-Ser(Bz)-OH und 408 µl (2,345 mmol) DIEA wurden in 50 ml 50 % Acetonitril gelöst. Dann wurden 335 mg (1,76 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde i.V. eingengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i.V. eingengt. Ausbeute: 289 mg (0,827 mmol) 71 %.

10

#### 1.7 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Glu(OBz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid

151 mg (0,433 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH und 194 mg (0,433 mmol) H-Glu(OBz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid x HCl wurden in 5 ml abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 225 mg (0,433 mmol) PyBOP und 230 µl (1,32 mmol) DIEA zugegeben. Nach 2 Std. wurde i.V. eingengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i.V. eingengt und ohne weitere Aufarbeitung nach Punkt 1.8 hydriert. Ausbeute: 270 mg (0,364 mmol) 84 %.

20

#### 1.8 Benzylsulfonyl-D-Ser-Glu-4-Amidino-benzylamid x TFA

270 mg (0,364 mmol) Bzls-D-Ser(Bz)-Glu(OBz)-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 30 ml 90 %iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden unter Argon 20 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Argon wurde durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt und der Ansatz unter kräftigem Rühren 24 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat i.V. eingengt und das Produkt

25

mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt (Acetonitril/H<sub>2</sub>O, 0,1 % Trifluoressigsäure, Elution bei 22,6 % Acetonitril).

## 2. Methoden

- 5 Analytische HPLC: Shimadzu LC-10A System, Säule: Vydac C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 4 mm) Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 10 % B bis 60 % B in 50 min, 1 ml/min Fluß, Detektion bei 220 oder 215 nm.

- 10 Präparative HPLC: Shimadzu LC-8A System, Säule: Knauer C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 32 mm) Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 10 % B bis 55 % B in 120 min, 10 ml/min Fluß, Detektion bei 220 nm.

Ausführungsbeispiel 2:

- 15 Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen mit Z = 4-Amidino

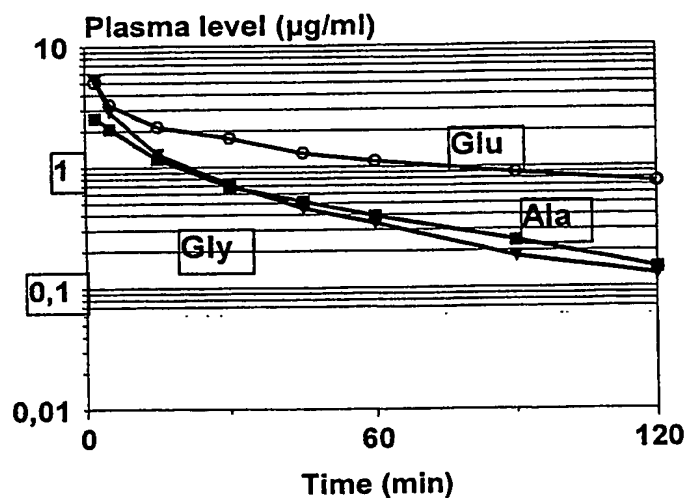
R <sub>5</sub>	Konfiguration R <sub>4</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	X-R <sub>2</sub>	Y-R <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> , µM
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	0,036
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH-CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	0,0077
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH-CH <sub>2</sub> -COOH	CH <sub>2</sub>	0,86
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	CH <sub>2</sub>	0,16

### Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden 200  $\mu$ l Tris-Puffer (0,05 M, 0,154 M NaCl, 5 % Ethanol, pH 8,0; enthält den Inhibitor), 25  $\mu$ l Substrat (Bz- $\beta$ Ala-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O) und 50  $\mu$ l sc-Urokinase bei 25 °C inkubiert. Nach 3 min wurde  
5 die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu$ l Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (Dynatech MR 5000) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K<sub>i</sub>-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

### Ausführungsbeispiel 3:

Elimination nach i.v.-Gabe von 1 mg/kg Körpergewicht an der Ratte von Deriva-  
ten des Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-amidinobenzylamids mit Ala bzw. Glu in  
15 P2-Position



### Tierversuche

Weibliche Wistar Ratten (240-300 g Körpergewicht) wurden narkotisiert (Ethylurethan 2,5 g/ml in NaCl, 0,5 ml/100 g Ratte), anschließend erfolgte die Präparation der am Hals gelegenen *A. carotis*. Ein in diesem Gefäß fixierter Katheter ermöglichte die Blutentnahme zu festgelegten Zeiten. Das Applikationsvolumen betrug 0,5 ml, als Applikationslösung wurde 0,9% NaCl eingesetzt. Blutproben à 500 µl (versetzt im Verhältnis 19 + 1 mit 1,04 M Natriumcitrat) wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 und 270 min. Der entstandene Blutverlust wurde unmittelbar nach Entnahme der Probe mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung kompensiert. Citratplasma wurde durch Zentrifugation des Blutes bei 1200\*g, für 10 min erhalten. Die Konzentration der Wirkstoffe im Plasma wurde mittels HPLC ermittelt.

### Verwendete Abkürzungen:

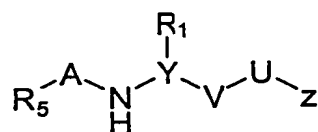
15	Ac	Acetyl
	Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
	Bz	Benzyl
	DIEA	Diisopropylethylamin
	DMF	N,N-Dimethylformamid
20	i.V.	im Vakuum
	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
	TEA	Triethylamin
	TFA	Trifluoressigsäure
25	THF	Tetrahydrofuran
	CMe	Cyclohexylmethyl
	iBu	iso-butyl

Curacyte AG

11. März 2002  
C37296 BÖ/ATe

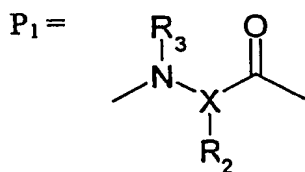
## Patentansprüche

### 1. Verbindung der allgemeinen Formel I

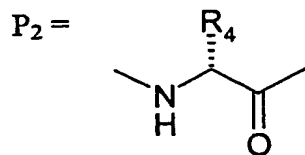


wobei

10 A P<sub>2</sub>—P<sub>1</sub> mit



und



ist;

25 R<sub>1</sub> H oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>COOR<sub>6</sub> mit a = 0, 1, 2, 3, 4 oder 5, vorzugsweise mit a = 0, 1 oder 2, ist, wobei R<sub>6</sub> ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist;

R<sub>2</sub> ein H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8 C-Atomen vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder

$-(CH_2)_cCOOR_8$  mit  $c = 1, 2, 3$  oder  $4$ , wobei  $R_8$  H oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist, oder

$-(CH_2)_d-OR_9$  mit  $d = 1, 2, 3$  oder  $4$ , wobei  $R_9$  H ist, oder

5  $-(CH_2)_eOR_{10}$ ,  $-(CH_2)_eSR_{10}$ ,  $-(CH_2)_e$ -Guanidino,  $-(CH_2)_e$ -Imidazol oder  $-(CH_2)_eNHR_{10}$  mit  $e = 1, 2, 3, 4$  oder  $5$  ist, wobei  $R_{10}$  ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1-16, insbesondere 1-8, vor allem 1-3 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 3 C-Atome, und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt;

15  $R_3$  H oder  $-(CH_2)_bR_7$  mit  $b = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $8$ , vorzugsweise mit  $b = 2$  oder  $3$ , ist, wobei  $R_7$  H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 10 C-Atomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder ein geladener Rest, vorzugsweise einer  $-(CH_2)_jCOOR_{13}$ ,  $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$ ,  $-(CH_2)_jNH_2$ ,  $-(CH_2)_j$ -Amidino-,  $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder  $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit  $j = 0, 1$  oder  $2$  ist, wobei  $R_{13}$  H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 4, vor allem Ethyl, ist;

20  $R_4$  ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8, vorzugsweise 1 bis 3, C-Atomen,  $-(CH_2)_fOR_{11}$ ,  $-(CH_2)_fSR_{11}$ , oder  $-(CH_2)_fNHR_{11}$  mit  $f = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $8$  ist, wobei  $R_{11}$  H ist;

25

$R_5$   $-(CH_2)_g(CH_3)_h$ ,  $-(CH_2)_i$ -Aryl mit  $g + h = i = 0, 1, 2$  oder  $3$ ,  $-SO_2R_{12}$ ,  $-COR_{12}$ , oder  $-COOR_{12}$  ist, wobei  $R_{12}$  ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis

2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist;

5 wobei  $R_5$  mit einer geladenen oder ungeladenen Gruppe, vorzugsweise einer  $-(CH_2)_jCOOR_{13}$ ,  $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$ ,  $-(CH_2)_jNH_2$ ,  $-(CH_2)_j$ -Amidino-,  $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder  $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit  $j = 0, 1$  oder 2 modifiziert sein kann, wobei  $R_{13}$  H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere Ethyl, ist;

10 U ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist oder ein Heterophenyl- oder Heterocyclohexylrest mit vorzugsweise mindestens einem N, S oder O als Heteroatom, insbesondere Pyridin, Piperidin oder Pyrimidin, ist;

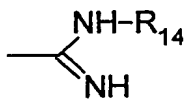
V  $(CH_2)_n$  mit  $n = 0, 1, 2$  oder 3, vorzugsweise 0, ist;

15 X N oder CH, vorzugsweise CH, ist;

Y N oder  $(CH)_m$  mit  $m = 0$  oder 1, vorzugsweise CH, ist;

Z in 3- oder 4-Position vorkommt und eine Aminomethyl-, eine Guanidino- oder eine Aminogruppe

20



25

ist, wobei  $R_{14}$  H, OH, NH,  $-COR_{15}$  oder  $-COOR_{15}$  ist, wobei  $R_{15}$  ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 4 und besonders bevorzugt 1 bis 2 C-Atome und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt;



dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere geladene Reste vorzugsweise  
abgeleitet von  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{H}$ ,  $\text{NH}_2$ , einer Amidino-, Hy-  
droxyamidino-, Amidrazono- oder Guanidinogruppe in den Resten  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$   
5 oder  $\text{R}_5$  vorhanden sind;

oder eine Verbindung der allgemeinen Formel I in Form eines Prodrugs oder  
in Form ihres Salzes.

10 2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei U an 1, 2 oder 3 Positionen vorzugswei-  
se mit einem Halogen, insbesondere Fluor oder Chlor, oder einem Methyl-,  
Ethyl-, Propyl-, Methoxy-, Ethoxy-, oder Propoxyrest substituiert ist.

15 3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine Carboxylgruppe als Ester,  
bevorzugt als Ethylester, geschützt vorliegt.

20 4. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form eines Pro-  
drugs, wobei  $\text{R}_9$  und/oder  $\text{R}_{11}$  in diesem Fall ein Alkylcarbonyl-, Aralkylcar-  
bonyl-, Alkyloxycarbonyl- oder Aralkyloxycarbonyl-Rest ist, wobei der Al-  
kylrest vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 C-Atome und der Arylrest  
vorzugsweise 5 bis 8, insbesondere 6 C-Atome besitzt.

25 5. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position  
steht und dass A die Aminosäuren Glu — D-Ser bedeutet und dass  $\text{R}_5$  ein mit  
einer Carboxylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis  
16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im

Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist, der an Glu gebunden ist.

- 5 6. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent am substituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ein Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor oder Chlor, ist.
- 10 7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass sequentiell die entsprechenden Aminosäuren an ein 4-Acetyloxamidinobenzylamin angekoppelt werden, wobei die N-terminale Aminosäure entweder den R<sub>5</sub>-Rest bereits trägt oder dieser anschließend daran gebunden wird.
- 15 8. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 20 9. Arzneimittel nach Anspruch 8, wobei das Arzneimittel in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-, Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspension, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt wird.
- 25 10. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 zur Therapie oder Prophylaxe eines Tumors, insbesondere in oraler, subkutaner, intravenöser oder transdermaler Form.

11. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 zur Diagnose eines Tumors.

## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose eines Tumors.